精料中直链与支链淀粉比对羔羊瘤胃细菌菌群的影响

于洋洋[1] 赵芳芳[1,2] 张爱忠[1*] 姜 宁[1] 李雁冰[1] 陈 勇[1]

（1.黑龙江八一农垦大学动物科技学院，大庆 163319；2.扬州大学动物科学与技术学院，扬州 225009）

摘 要：本文旨在研究精料中直链与支链淀粉比对不同日龄羔羊瘤胃细菌菌群的影响。选取 48 只体重无显著差异的初生公羔（$P>0.05$），随机分成 4 组（每组 3 个重复，每个重复 4 只），各组精料中直链与支链淀粉比分别为 0.12（木薯淀粉组）、0.23（玉米淀粉组）、0.24（小麦淀粉组）和 0.48（豌豆淀粉组）。试验全期共 77 d。于羔羊 21、35、56 和 77 日龄时，每个重复随机选择 1 只羔羊屠宰，采集瘤胃液样品。通过 PCR-变性梯度凝胶电泳（DGGE）技术测定分析羔羊瘤胃细菌菌群的多样性。结果表明，不同直链与支链淀粉比精料组的羔羊于 21、35、56 和 77 日龄时，瘤胃细菌多样性指数、均匀度和丰富度均无显著性差异（$P>0.05$）。21 日龄羔羊瘤胃细菌多样性指数显著高于 35 日龄（$P<0.05$），56 和 77 日龄羔羊瘤胃细菌多样性指数有所升高，但在数值上仍低于 21 日龄羔羊。DGGE 回收的条带多属厚壁菌门及拟杆菌门。56 日龄的小麦淀粉组羔羊瘤胃内牛单胞月形菌含量较高。由此可见，不同直链与支链淀粉比精料未影响羔羊瘤胃优势细菌的结构，但饲喂小麦淀粉饲粮可促进 56 日龄羔羊瘤胃内牛单胞月形菌的生长。

关键词：直链与支链淀粉比；羔羊；PCR-变性梯度凝胶电泳；瘤胃细菌菌群；多样性指数

中图分类号：S826

在羔羊的饲粮中，牧草所占的比例通常较低，因为牧草中的干物质较少，在瘤胃中的发酵率低。而谷物饲料是羔羊饲粮的主要成分，谷物中的主要营养成分为淀粉。淀粉是由多个葡萄糖基单元通过糖苷键结合成的高分子多糖，主要由 2 种分子结构组成：直链和支链。通常情况下，淀粉同时含有直链和支链 2 种形式[1-2]。相关研究证明，二者比例不同会影响羔羊的生理功能。刘文[3]研究发现饲喂高直链与支链淀粉比的豌豆淀粉饲粮，能提高羔羊血液中免疫球蛋白的浓度，并对羔羊的生长性能及肉品质有较好的影响。Ren 等[4]研究了不同直链与支链淀粉比饲粮对育肥羔羊胃肠道发育的影响，发现

收稿日期：2017-05-04

基金项目：国家自然科学基金面上项目（31372338）

作者简介：于洋洋（1992-），女，黑龙江双鸭山人，硕士研究生，从事饲料资源开发与利用研究。E-mail: 739254249@qq.com

*通信作者：张爱忠，教授，博士生导师，E-mail: aizhzhang@sina.com

不同直链与支链淀粉比会显著影响羔羊肠道的发育。瘤胃是羔羊非常重要的消化器官之一，营养物质的消化主要依靠瘤胃中的微生物。微生物对发酵底物具有选择性，可通过发酵摄入的底物间接改变瘤胃微生态环境[5]，因此，不同直链与支链淀粉比的精料在瘤胃中发酵可能会对瘤胃中的微生物产生一定的影响。一些研究表明，单胃动物在不同日龄时的肠道菌群结构存在差异[6-7]。那么，羔羊在不同日龄时的瘤胃细菌菌群结构是否也存在着差异。目前，关于淀粉与不同日龄反刍动物瘤胃细菌菌群关系的报道仍相对较少。因此，本试验采用 PCR-变性梯度凝胶电泳（DGGE）技术，研究精料中不同直链与支链淀粉比对不同日龄羔羊瘤胃细菌菌群的影响，对于深入了解不同淀粉组成对反刍动物消化道健康的影响至关重要。同时，也为充分发挥淀粉作为营养源对反刍动物肠道健康和机体健康的保障作用提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物及设计

试验采用单因素随机设计，选择健康、初生重无显著差异的 48 只初生公羔（P>0.05），随机分成 4 组，每组 3 个重复，每个重复 4 只。试验全期 77 d。分别在 21、35、56 和 77 日龄，在每个重复中选择 1 只羔羊屠宰，并进行指标的测定。

1.1.2 试验饲粮

试验精料的配制参照 NRC（1985）建议的育肥羔羊营养需要量进行。分别选择木薯淀粉（TS）、玉米淀粉（CS）、小麦淀粉（WS）和豌豆淀粉（PS）作为各组羔羊饲粮中唯一的淀粉来源，配制 4 种在淀粉和氮含量以及能量水平基本一致的试验精料。试验中所选用的淀粉源均为食品级（上海龙凤食品有限公司）。精料中直链和支链淀粉的含量根据 Englyst 等[8]描述的方法进行分析测定。TS、CS、WS 和 PS 中直链与支链淀粉比分别为 0.12、0.23、0.24 和 0.48。试验精料组成及营养水平见表 1。

表 1 试验精料组成及营养水平（风干基础）

Table 1 Composition and nutrient levels of experimental concentrates （air-dry basis）

项目 Items	组别 Groups			
	TS	CS	WS	PS
原料 Ingredients/%				
木薯淀粉 TS	50.25			
玉米淀粉 CS		50.25		
小麦淀粉 WS			50.25	
豌豆淀粉 PS				50.25

豆粕 Soybean meal	29.00	29.00	29.00	29.00
玉米蛋白粉 Corn protein meal	14.80	14.80	14.80	14.80
豆油 Soybean oil	1.60	1.60	1.60	1.60
石粉 Limestone	0.80	0.80	0.80	0.80
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1.20	1.20	1.20	1.20
食盐 NaCl	0.35	0.35	0.35	0.35
预混料 Premix[1)]	2.00	2.00	2.00	2.00
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]				
总淀粉 Total starch/%	43.72	44.01	44.00	44.97
直链淀粉占总淀粉比 Amylose/total starch/%	10.70	18.70	19.36	32.42
支链淀粉占总淀粉比 Amylopectin/total starch/%	89.30	81.30	80.64	67.58
直链与支链淀粉比 Amylose/amylopectin	0.12	0.23	0.24	0.48
干物质 DM	90.14	90.14	90.14	89.88
粗蛋白质 CP	19.77	19.87	19.88	19.79
钙 Ca	0.76	0.76	0.76	0.76
磷 P	0.58	0.58	0.60	0.58
消化能 DE/（MJ/kg）	14.23	14.27	14.20	14.25

[1)]每千克预混料含有 One kg of premix provided the following：Zn 5 200 mg，Cu 1 200 mg，Mn 4 000 mg，Fe 6 000 mg，I 40 mg，Co 35 mg，Se 20 mg，VA 940 IU，VE 20 IU。

[2)] 消化能为计算值，其余为实测值。DE was a calculated value, while others were measured values.

1.1.3 羔羊的饲养管理

试验前 1 周清扫、冲洗羊舍，并进行消毒处理。羔羊进行全舍饲饲养，采用瓶喂法人工哺乳至 56 日龄，并于产后 7 天补饲对应的试验精料及优质苜蓿，并供应充足清洁饮水。每日饲喂 4 次（04:30、10:00、15:30 和 21:00）。试验全期定时进行畜舍消毒，密切观察羔羊健康状况。

1.2 样品采集

分别在 21、35、56 和 77 日龄，在每个重复中选择 1 只羔羊，颈静脉放血致死后打开腹腔，采集羔羊瘤胃内容物，经无菌 4 层纱布过滤后，分装到无菌冻存管中，迅速投入液氮中带回实验室-80 ℃保存，用于微生物菌群的测定分析。

1.3 瘤胃液基因组 DNA 的提取及 16S rDNA V6~V8 区的扩增

采用十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）/十二烷基硫酸钠（SDS）方法提取各样品基因组 DNA，以基因组 DNA 为模板，选择通用引物 U968-GC-F 和 L1401R 扩增 16S rDNA 的基因序列，引物信息见表 2。

表 2　引物信息

Table 2　Information of primers

引物 Primer	序列 Sequence(5′-3′)	参考文献 Reference
U968F	AACGCGAAGAACCTTAC	Huo 等[9]
L1401R	CGGTGTGTACAAGACCC	
U968-GC-F	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC	

GC 夹子结构采用下划线标出。

GC hairpin structure was underlined.

PCR 扩增体系（50 μL）为：10×PCR buffer 5 μL；dNTP（2.5 mmol/L）3.2 μL；rTaq（5 U/μL）0.4 μL；U968-GC-F（20 μmol/L）1 μL；L1401R（20 μmol/L）1 μL；模板 DNA 50 ng；补 ddH_2O 至 50 μL。PCR 扩增程序为：预变性（94 ℃ 5 min）；解链（94 ℃ 30 s），退火（56 ℃ 20 s），延伸（72 ℃ 40 s），共 35 个循环；最终 72 ℃延伸 7 min。

1.4　PCR 产物的 DGGE 分析

取 10 μL PCR 产物进行 DGGE 分析。采用变性梯度为 35%～62%、浓度为 8%的聚丙烯酰胺凝胶在 1×TAE 缓冲液中 80 V、60 ℃下电泳 16 h。电泳结束后采用银染法染色。

1.5　DGGE 图谱中优势条带的回收与测序

用灭菌的手术刀切下目的条带，采用 Omega 公司 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的条带，以 2 μL 回收产物为模板，以 U968F/L1401R（不含 GC 夹子）为引物进行 PCR 扩增，获得目的 DNA 片段。将重新扩增的 DNA 片段切胶回收、纯化处理后，连接到 PMD18-T 载体上，并转化至 DH5α 感受态细胞中，筛选阳性克隆。菌液由华大基因对插入的细菌 16S rDNA 片段序列进行测定。

1.6　多样性指数、相似性系数及条带测序

细菌多样性指数是用来表示群落物种数、个体数和均匀度的综合指标。根据 DGGE 图谱中各泳道样品条带数目和每个条带的强度，分析各组样品中细菌多样性指数、均匀度和丰富度。采用 Quantity one 软件对 DGGE 图谱中各泳道条带数目、条带强度进行数字化分析。多样性指数、均匀度和丰富度计算公式如下：

$$H=-\sum_{i=1}^{S} pi\ln pi=-\sum_{i=1}^{S}(Ni/N)\ln(Ni/N);$$

$$E=H/H\max=H/\ln S;$$

$$R=S。$$

式中：H 为多样性指数；E 为均匀度；R 为丰富度；pi 为样品中单一条带的强度占该泳道全部条带总强度的比率；N 为 DGGE 图谱某一单一泳道上全部条带的强度；Ni 为第 i 条带的强度；S 是某样品中总条带数目。

利用戴斯系数计算各组样品间 PCR-DGGE 图谱的相似性，计算公式如下：

$$Cs=2j/(a+b)$$

式中：j 是样品 A 与 B 间相同的条带；a 和 b 分别是各自的条带数。

克隆条带测序结果于 GenBank 中进行序列对比分析，获得序列分类的信息，序列上传至 NCBI 获得序列登录号。

1.7 数据处理与分析

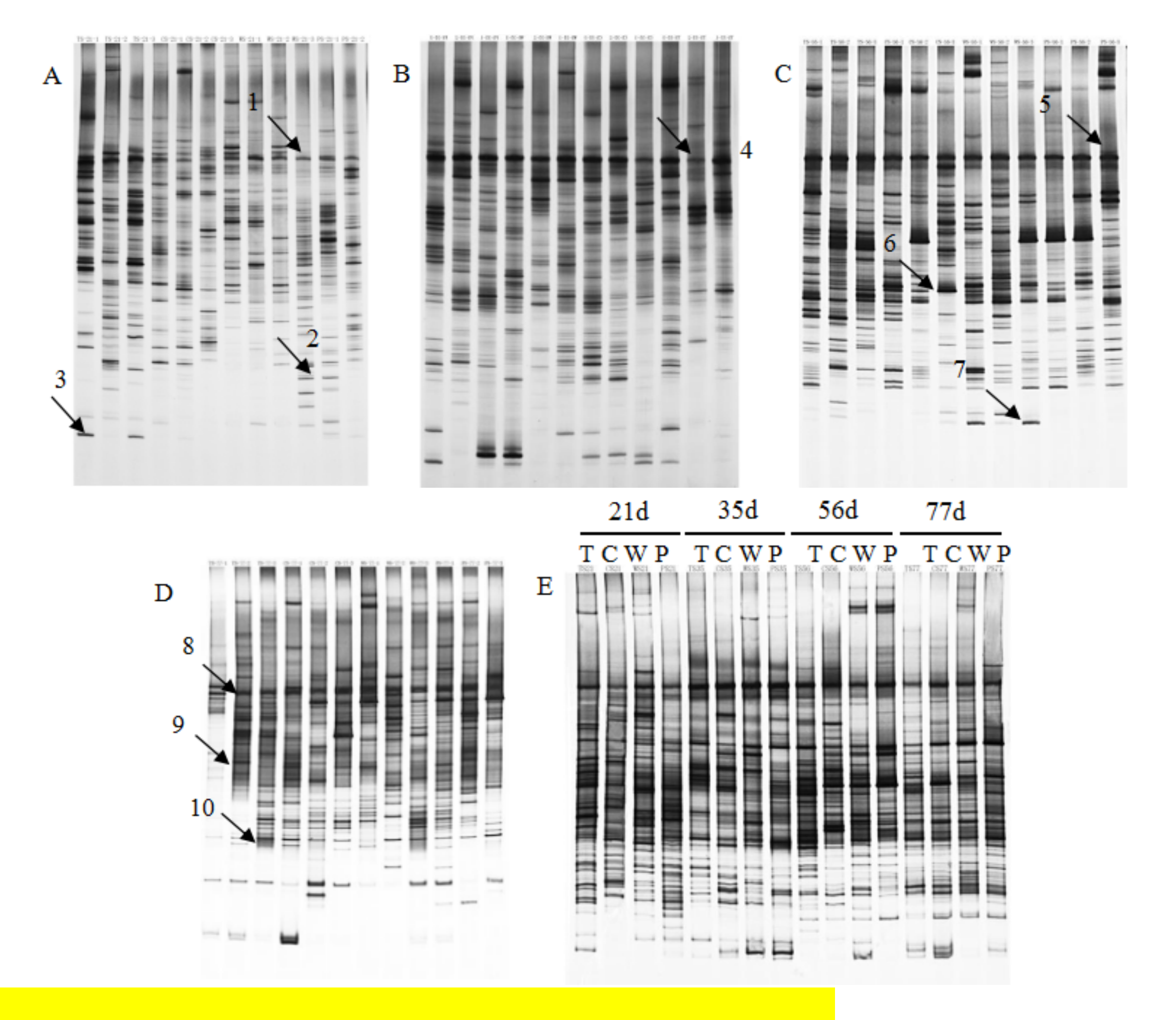
DGGE 图谱数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析，并用 Duncan 氏法进行多重比较检验，测定结果以平均值±标准差表示。统计分析结果以 $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物的 DGGE 分析结果

分别从饲喂不同直链与支链淀粉比精料的 21、35、56 和 77 日龄羔羊瘤胃内容物中提取总 DNA。经电泳分析，瘤胃微生物基因组 DNA 片段较大，且条带清晰，可用于后续 PCR 扩增分析。基因组 DNA 经 V6~V8 区通用引物（U968-GC-F 和 L1401R）PCR 扩增后得到的 16S rDNA 片段大小为 480 bp 左右，可用于后续 DGGE 分析。

瘤胃细菌 16S rDNA PCR 产物的 DGGE 图谱分析结果见图 1。PCR-DGGE 图谱中，强度高的电泳条带代表优势菌群，条带数量越多代表细菌丰富度越高，条带位置则代表细菌种类。由此可见，饲喂不同直链与支链淀粉比精料的羔羊在不同日龄时具有丰富的电泳条带。不同组羔羊于 21、35、56 和 77 日龄时瘤胃内细菌有共同的优势条带，如条带 1、4、5、6、8、9 和 10；同时，不同组羔羊于 21 和 56 日龄也出现了特征条带，如条带 2、3 和 7。不同泳道的条带强度、数量及位置的差异表明，同一日龄下精料中不同直链与支链淀粉比之间和同一直链与支链淀粉比下不同日龄之间羔羊瘤胃细菌菌群的结构组成均存在差异。不同日龄羔羊瘤胃内也存在共同的优势条带。



T：TS 组 TS group;C:CS 组 CS group;W:WS 组 WS group；P：PS 组 PS group。

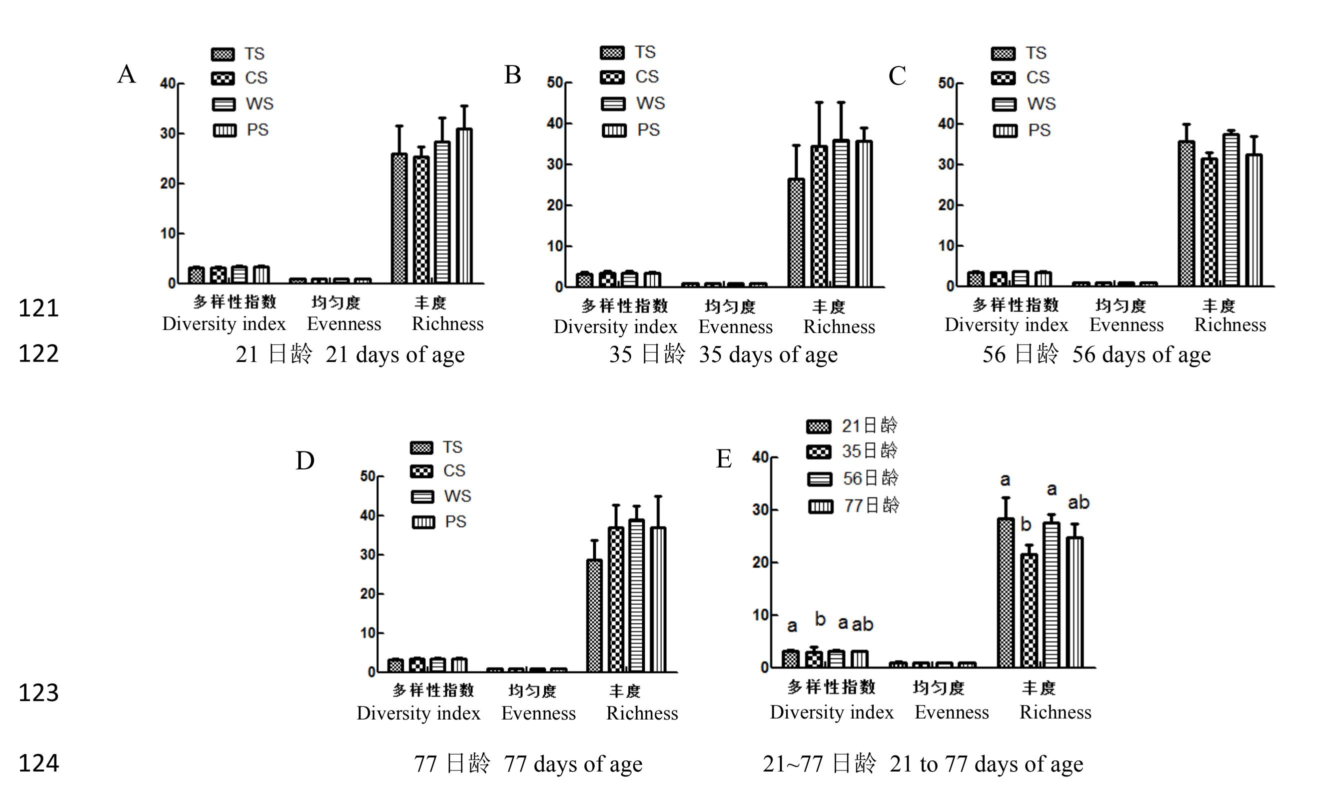
A.21 日龄 21 days of age；B.35 日龄 35 days of age；C.56 日龄 56 days of age；D.77 日龄 77 days of age；E.21~77 日龄 21 to 77 days of age。

图 1 不同日龄羔羊瘤胃细菌 16S rDNA PCR 产物的 DGGE 图谱

Fig.1 DGGE profile of 16S rDNA PCR products from rumen bacteria in lambs at different days of age

2.2 细菌 16S rDNA V6~V8 区 PCR-DGGE 图谱多样性分析

细菌 16S rDNA V6~V8 区 PCR-DGGE 图谱多样性分析见图 2。饲喂不同直链与支链淀粉比精料的羔羊瘤胃微生物多样性指数于 21、35、56 和 77 日龄时无显著性差异（P>0.05）。不同日龄对羔羊瘤胃细菌多样性的影响结果表明，多样性指数和丰富度随日龄增加有所降低，且 21 日龄显著高于 35 日龄（P<0.05），略高于 56 和 77 日龄（P>0.05），各日龄间羔羊瘤胃细菌均匀度差异不显著（P>0.05）。



数据柱形标注不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

Value columns with different small letters mean significant difference (P<0.05).

图 2 瘤胃细菌 16S rDNA V6~V8 区 PCR-DGGE 图谱的多样性分析

Fig.2 Diversity analysis of V6 to V8 of rumen bacterial 16S rDNA PCR-DGGE profile

2.3 细菌 16S rDNA V6~V8 区 PCR-DGGE 图谱相似性分析

饲喂不同直链与支链淀粉比精料对 21、35、56 和 77 日龄羔羊瘤胃细菌相似性的影响分别见表 3、表 4、表 5 和表 6。不同日龄对羔羊瘤胃细菌相似性的影响见表 7。结果显示，饲喂不同直链与支链淀粉比精料的羔羊 21、35、56 和 77 日龄瘤胃细菌无明显的组内相似性；但随日龄增加组内羔羊瘤胃细菌相似性系数有所提高。而相同日龄的平行样本间瘤胃细菌具有相对较高的相似性。

表 3 戴斯系数比较 21 日龄羔羊瘤胃细菌 PCR-DGGE 图谱的相似性

Table 3 Comparison of PCR-DGGE profile similarity of rumen bacteria in lambs at 21 days of age by Dice coefficients

泳道 Lane	TS21-1	TS21-2	TS21-3	CS21-1	CS21-2	CS21-3	WS21-1	WS21-2	WS21-3	PS21-1	PS21-2	PS21-3
TS21-1	100.0	18.6	32.4	20.7	17.3	20.8	30.5	19.7	19.4	25.2	33.0	20.9
TS21-2	18.6	100.0	41.2	44.8	36.2	24.8	37.7	20.0	25.2	38.0	36.7	27.0
TS21-3	32.4	41.2	100.0	40.4	19.5	25.0	45.1	27.7	36.1	44.8	38.0	41.9
CS21-1	20.7	44.8	40.4	100.0	38.7	21.1	40.0	33.5	46.4	38.4	42.7	31.8
CS21-2	17.3	36.2	19.5	38.7	100.0	36.0	26.3	21.2	31.9	27.0	31.1	38.5
CS21-3	20.8	24.8	25.0	21.1	36.0	100.0	32.3	21.6	30.1	18.6	19.9	41.1
WS21-1	30.5	37.7	45.1	40.0	26.3	32.3	100.0	37.9	55.7	37.0	44.6	31.1

WS21-2	19.7	20.0	27.7	33.5	21.2	21.6	37.9	100.0	26.2	24.5	35.2	34.8
WS21-3	19.4	25.2	36.1	46.4	31.9	30.1	55.7	26.2	100.0	32.8	33.0	23.9
PS21-1	25.2	38.0	44.8	38.4	27.0	18.6	37.0	24.5	32.8	100.0	44.1	36.5
PS21-2	33.0	36.7	38.0	42.7	31.1	19.9	44.6	35.2	33.0	44.1	100.0	32.7
PS21-3	20.9	27.0	41.9	31.8	38.5	41.1	31.1	34.8	23.9	36.5	32.7	100.0

样本编号组成为：组别日龄-编号。下表同。

Sample No. was showed as follows: group days of age-No.. The same as below.

表 4　戴斯系数比较 35 日龄羔羊 PCR-DGGE 图谱的相似性

Table 4　Comparison of PCR-DGGE profile similarity of rumen bacteria in lambs at 35 days of age by Dice coefficients

泳道 Lane	TS35-1	TS35-2	TS35-3	CS35-1	CS35-2	CS35-3	WS35-1	WS35-2	WS35-3	PS35-1	PS35-2	PS35-3
TS35-1	100.0	39.4	27.2	17.3	28.7	33.8	25.9	35.4	29.4	31.4	16.3	29.3
TS35-2	39.4	100.0	27.8	15.2	25.8	30.4	19.3	23.0	25.1	22.5	23.3	27.4
TS35-3	27.2	27.8	100.0	28.5	44.5	35.1	34.1	32.7	40.6	30.3	42.7	36.9
CS35-1	17.3	15.2	28.5	100.0	32.1	30.0	30.5	33.8	37.8	34.6	30.6	39.8
CS35-2	28.7	25.8	44.5	32.1	100.0	45.5	34.2	33.9	44.4	39.9	36.9	33.8
CS35-3	33.8	30.4	35.1	30.0	45.5	100.0	45.1	46.9	46.2	41.4	38.4	40.8
WS35-1	25.9	19.3	34.1	30.5	34.2	45.1	100.0	29.9	32.8	31.6	34.0	29.5
WS35-2	35.4	23.0	32.7	33.8	33.9	46.9	29.9	100.0	38.0	33.6	32.8	33.3
WS35-3	29.4	25.1	40.6	37.8	44.4	46.2	32.8	38.0	100.0	53.0	35.6	40.6
PS35-1	31.4	22.5	30.3	34.6	39.9	41.4	31.6	33.6	53.0	100.0	29.0	25.7
PS35-2	16.3	23.3	42.7	30.6	36.9	38.4	34.0	32.8	35.6	29.0	100.0	34.9
PS35-3	29.3	27.4	36.9	39.8	33.8	40.8	29.5	33.3	40.6	25.7	34.9	100.0

表 5　戴斯系数比较 56 日龄羔羊 PCR-DGGE 图谱的相似性

Table 5　Comparison of PCR-DGGE profile similarity of rumen bacteria in lambs at 56 days of age by Dice coefficients

泳道 Lane	TS56-1	TS56-2	TS56-3	CS56-1	CS56-2	CS56-3	WS56-1	WS56-2	WS56-3	PS56-1	PS56-2	PS56-3
TS56-1	100.0	55.6	36.8	48.1	52.3	43.4	41.7	51.2	50.6	37.3	33.7	39.6
TS56-2	55.6	100.0	30.8	49.7	44.8	55.2	47.7	44.2	47.3	24.3	37.8	38.2
TS56-3	36.8	30.8	100.0	39.0	37.4	30.0	26.4	36.5	36.4	24.7	32.4	34.1
CS56-1	48.1	49.7	39.0	100.0	60.3	39.3	43.6	41.1	50.6	45.2	39.7	43.0
CS56-2	52.3	44.8	37.4	60.3	100.0	40.4	45.3	36.6	58.7	50.9	46.6	43.9
CS56-3	43.4	55.2	30.0	39.3	40.4	100.0	45.0	41.4	43.6	22.8	36.5	33.7
WS56-1	41.7	47.7	26.4	43.6	45.3	45.0	100.0	40.4	55.0	32.8	35.2	51.3
WS56-2	51.2	44.2	36.5	41.1	36.6	41.4	40.4	100.0	37.6	19.6	29.2	33.1
WS56-3	50.6	47.3	36.4	50.6	58.7	43.6	55.0	37.6	100.0	36.6	47.5	44.1
PS56-1	37.3	24.3	24.7	45.2	50.9	22.8	32.8	19.6	36.6	100.0	31.0	35.1
PS56-2	33.7	37.8	32.4	39.7	46.6	36.5	35.2	29.2	47.5	31.0	100.0	42.2
PS56-3	39.6	38.2	34.1	43.0	43.9	33.7	51.3	33.1	44.1	35.1	42.2	100.0

表 6　戴斯系数比较 77 日龄羔羊 PCR-DGGE 图谱的相似性

Table 6　Comparison of PCR-DGGE profile similarity of rumen bacteria in lambs at 77 days of age by Dice coefficients

泳道 Lane	TS77-1	TS77-2	TS77-3	CS77-1	CS77-2	CS77-3	WS77-1	WS77-2	WS77-3	PS77-1	PS77-2	PS77-3
TS77-1	100.0	35.7	39.2	32.0	38.0	36.3	27.3	27.9	31.8	35.1	39.0	30.9
TS77-2	35.7	100.0	52.4	49.9	39.0	42.4	29.8	42.6	33.0	31.7	37.6	45.4
TS77-3	39.2	52.4	100.0	58.6	43.7	38.8	35.0	44.2	46.1	38.7	37.3	42.2
CS77-1	32.0	49.9	58.6	100.0	47.4	48.7	43.0	43.9	48.8	42.9	44.1	42.5
CS77-2	38.0	39.0	43.7	47.4	100.0	54.3	45.4	37.6	52.6	46.2	35.2	42.3
CS77-3	36.3	42.4	38.8	48.7	54.3	100.0	41.9	29.6	44.2	37.5	37.7	29.9
WS77-1	27.3	29.8	35.0	43.0	45.4	41.9	100.0	34.8	45.2	46.4	36.8	34.3
WS77-2	27.9	42.6	44.2	43.9	37.6	29.6	34.8	100.0	40.1	38.7	31.0	50.0
WS77-3	31.8	33.0	46.1	48.8	52.6	44.2	45.2	40.1	100.0	56.4	43.8	46.0
PS77-1	35.1	31.7	38.7	42.9	46.2	37.5	46.4	38.7	56.4	100.0	55.0	47.9
PS77-2	39.0	37.6	37.3	44.1	35.2	37.7	36.8	31.0	43.8	55.0	100.0	45.7
PS77-3	30.9	45.4	42.2	42.5	42.3	29.9	34.3	50.0	46.0	47.9	45.7	100.0

表 7　戴斯系数比较不同日龄羔羊 PCR-DGGE 图谱的相似性

Table 7　Comparison of PCR-DGGE profile similarity of rumen bacteria in lambs at different days of age by Dice coefficients

ne	TS21	CS21	WS21	PS21	TS35	CS35	WS35	PS35	TS56	CS56	WS56	PS56	TS77	CS77	WS7
	100.0	34.7	39.5	47.4	30.8	40.2	28.8	24.7	31.8	33.2	36.0	28.6	33.5	25.3	29.
	34.7	100.0	42.3	29.1	27.2	36.8	32.5	31.5	29.0	25.5	37.1	24.6	28.1	31.1	43.
	39.5	42.3	100.0	31.9	45.3	51.9	51.6	38.3	55.5	39.0	49.6	35.3	45.9	35.1	47.
	47.4	29.1	31.9	100.0	36.7	45.9	43.8	37.0	42.8	39.1	35.9	31.3	43.9	31.2	35.
	30.8	27.2	45.3	36.7	100.0	59.8	62.4	53.1	46.5	51.0	40.3	35.5	39.8	37.8	34.
	40.2	36.8	51.9	45.9	59.8	100.0	65.2	49.8	42.9	47.8	40.3	36.7	41.3	31.5	37.
	28.8	32.5	51.6	43.8	62.4	65.2	100.0	53.3	53.8	48.7	51.3	43.4	51.1	41.8	43.
	24.7	31.5	38.3	37.0	53.1	49.8	53.3	100.0	43.7	48.9	44.3	37.6	39.5	41.4	35.
	31.8	29.0	55.5	42.8	46.5	42.9	53.8	43.7	100.0	54.2	47.9	40.3	59.8	52.0	46.
	33.2	25.5	39.0	39.1	51.0	47.8	48.7	48.9	54.2	100.0	41.2	47.0	46.1	45.0	39.
	36.0	37.1	49.6	35.9	40.3	40.3	51.3	44.3	47.9	41.2	100.0	61.4	60.3	53.1	55.
	28.6	24.6	35.3	31.3	35.5	36.7	43.4	37.6	40.3	47.0	61.4	100.0	47.4	53.0	53.
	33.5	28.1	45.9	43.9	39.8	41.3	51.1	39.5	59.8	46.1	60.3	47.4	100.0	56.4	53.
	25.3	31.1	35.1	31.2	37.8	31.5	41.8	41.4	52.0	45.0	53.1	53.0	56.4	100.0	60.
	29.7	43.0	47.7	35.6	34.4	37.0	43.1	35.5	46.3	39.9	55.6	53.2	53.8	60.8	100.
	26.5	29.4	45.5	29.3	39.2	33.8	42.3	35.1	56.4	44.6	56.7	51.8	60.2	63.5	71.

2.4 DGGE 图谱共有和特征条带的序列分析

从 DGGE 图谱上共回收 10 个条带(图 1)，克隆测序结果见表 4。其中，条带 1 是饲喂不同直链与支链淀粉比精料的羔羊 21 日龄共有，测序后最接近 *Butyricimonas virosa*，条带 4 是饲喂不同直链与支链淀粉比精料的羔羊 35 日龄共有，测序后最接近 *Prevotella ruminicola*；条带 5 和 6 是饲喂不同直链与支链淀粉比精料的羔羊 56 日龄共有，测序后最接近 *Propionispira arcuata*、生痰月形单胞菌(*Selenomonas sputigena*)；条带 8、9 和 10 是饲喂不同直链与支链淀粉比精料的羔羊 77 日龄共有，测序后最接近布氏瘤胃球菌(*Ruminococcus bromii*)、*Prevotella multisaccharivorax*、*Prevotella dentalis*。PS 组羔羊 21 日龄时 2 个试验重复出现条带 2，而其他组羔羊未检测到，测序后最接近 *Butyricimonas paravirosa*；条带 3 代表的细菌在 21 日龄的 TS 组羔羊瘤胃内含量相对较高，测序后最接近 *Prevotella marshii*；条带 7 代表的细菌在 56 日龄的 WS 组羔羊瘤胃内含量相对最高，测序后最接近牛单胞月形菌（*Selenomonas bovis*）。所测定的 10 个条带多属于厚壁菌门和拟杆菌门。条带 2 与数据库中同源性最高的 *Butyricimonas paravirosa* 的相似性仅为 88%，而与未培养细菌的相似性为 96%，因此该序列所代表的可能为新的未培养细菌。条带 3 与数据库中同源性最高的 *Prevotella marshiia* 的相似性仅为 90%，而与未培养瘤胃细菌的相似性为 93%，因此这个序列所代表的有可能为新的未培养瘤胃细菌。

表 8 DGGE 回收条带的基因片段序列的比对结果

Table 8 Comparison of genomic sequences in bands of DGGE by sequencing and BLAST analysis

条带编号 Band No.	最相似菌种名称 Closest strain	GenBank 登录号 GenBank accession No.	同源性 Homology/%	最相似类群 Closest group
1	*Butyricimonas virosa*	NR_041691	98	拟杆菌门 Bacteroidetes
2	*Butyricimonas paravirosa*	NR_126195	88	拟杆菌门 Bacteroidetes
	未培养细菌 Uncultured bacterial	EF 445218	96	
3	*Prevotella marshii*	NR_113111	90	拟杆菌门 Bacteroidetes
	未培养瘤胃细菌 Uncultured rumen bacteria	HQ 399714	93	
4	*Prevotella ruminicola*	NR_102887	93	拟杆菌门 Bacteroidetes
5	*Propionispira arcuata*	NR_134138	93	厚壁菌门 Firmicutes
6	生痰月形单胞菌 *Selenomonas sputigena*	NR_025115	93	厚壁菌门 Firmicutes
7	牛单胞月形菌 *Selenomonas bovis*	NR_044111	98	厚壁菌门 Firmicutes
8	布氏瘤胃球菌 *Ruminococcus bromii*	NR_025930	95	厚壁菌门 Firmicutes
9	*Prevotella multisaccharivorax*	NR_041285	91	拟杆菌门 Bacteroidetes
10	*Prevotella dentalis*	NR_102481	91	拟杆菌门 Bacteroidetes

3 讨 论

反刍动物胃肠道内的微生物多以厚壁菌门和拟杆菌门为主[10-11]。已有研究表明，20 日龄羔羊瘤胃已经出现了普雷沃氏菌门、瘤胃壁细菌门及拟杆菌门的细菌[12]，且在 21 日龄时，羔羊瘤胃内的微生物已可以消化部分成年羊可利用的饲料[13]。随着日龄的增长和采食量的增加，兼性厌氧菌逐步被厌氧菌取代[14]，此阶段羔羊瘤胃内的优势菌不稳定，但依然以拟杆菌门和厚壁菌门为优势菌[12]。在本研究中，DGGE 图谱中条带的测序结果显示，所测序的共有条带和特征条带多属厚壁菌门和拟杆菌门，与前人研究结果一致。

增进对瘤胃微生物种属多样性和种群密度的了解是改善瘤胃发酵功能的前提。而瘤胃微生物群落结构受到宿主遗传背景、健康和饲粮等因素的影响,并且表现出地域、季节和饲喂方式之间的区别[15]。DGGE 图谱分析得出的多样性指数越大，就表示物种多样性越高；均匀度越接近于 1，表示均匀程度越高，相应的优势物种不明显；丰富度的高低，表示物种数目的多少。通常情况下，微生物多样性高则生态系统会更加稳定。本研究发现，饲喂不同直链与支链淀粉比精料的羔羊于 21、35、56 和 77 日龄时瘤胃内细菌多样性指数、均匀度和丰富度均无显著性差异。张永婧等[16]研究发现，与小麦麸饲粮组相比，大豆皮饲粮组猪回肠食糜中微生物的多样性显著提高，与本试验研究结果不一致。田亚东等[17]研究发现，饲喂分别以玉米、小麦、大米为单一淀粉源配制的饲粮未能影响肉仔鸡肠道菌群的多样性和均匀度，与本试验的研究结果相似。因为前人研究的对于通过饲粮调节来改变动物消化道微生物的研究结果不一致，所以从本试验研究结果可以反映出，饲喂不同直链与支链淀粉比精料对羔羊瘤胃内优势菌无显著性影响，而是否存在菌群组成的细微变化有待于深入研究。

哺乳动物和禽类在刚出生时胃肠道内的微生物数量较少，而随着采食饲料和与外界环境的接触，胃肠道菌群逐渐增多。本试验研究日龄对羔羊瘤胃细菌多样性影响的结果发现，21 日龄羔羊瘤胃内细菌多样性指数显著高于 35 日龄，到达 56 和 77 日龄后有所上升，但数值上依然低于 21 日龄。瘤胃微生物呈现这种由高降低后再升高的变化可能是随着羔羊日龄的增加，其饮食和生长环境在变化，对精料和牧草的采食量增多，瘤胃内细菌菌群结构变化较大，在适应之后瘤胃细菌逐渐增多，并趋于稳定状态。

本试验中，结合 DGGE 图谱和条带的测序结果发现，分别在 21、35、56 和 77 日龄时，4 组羔羊瘤胃内存在着以厚壁菌门和拟杆菌门为主的共有菌，且含有与营养物质代谢相关的菌。21 日龄时，在 4 组羔羊瘤胃内均检测到 *Butyricimonas virosa*。研究发现 *Butyricimonas*

virosa 是从鼠粪便中分离出的一种能够利用葡萄糖，其发酵终产物为丁酸和异丁酸的菌种[18]。因此，可以推测早期补饲不同淀粉源的饲粮可通过促进 *Butyricimonas virosa* 的增长繁殖，产生短链脂肪酸尤其是丁酸，进而促进幼龄动物瘤胃发育。77 日龄时，在 4 组羔羊瘤胃内均检测到 *Ruminococcus bromii*。有研究报道，*Ruminococcus bromii* 可以将人体肠道内大分子的碳水化合物分解成单糖或寡糖提供给其他细菌，有利于 *Eubacterium*、*Bifidobacterium*、*Anaerostipes* 等细菌的生长[19]。因此，在 77 日龄时饲喂不同淀粉源的饲粮可能对瘤胃健康起着非常重要的作用。另外，本试验从 DGGE 凝胶上回收了 3 个特征性条带，分别为：条带 2（代表未培养细菌）、条带 3（代表未培养瘤胃细菌）和条带 7（代表 *Selenomonas bovis*）。*Selenomonas bovis* 是牦牛瘤胃内容物中分离出来的一种菌，可发酵阿拉伯糖、葡萄糖、甘露糖等，其发酵葡萄糖的终产物为乙酸和丙酸[20]。本试验中，WS 组 3 个试验重复中均检测到了 *Selenomonas bovis*。由此可知，小麦淀粉饲粮能促进 *Selenomonas bovis* 在羔羊瘤胃内的生长繁殖。

4 结 论

① 基于 PCR-DGGE 分析得出，不同直链与支链淀粉比精料对羔羊瘤胃内优势细菌的多样性无显著性影响；随日龄增加瘤胃细菌多样性由高降低后再升高。

② 饲喂小麦淀粉饲粮可促进 56 日龄羔羊瘤胃内 *Selenomonas bovis* 的生长。

参考文献：

[1] TESTER R F,KARKALAS J,QI X.Starch-composition,fine structure and architecture[J].Journal of Cereal Science,2004,39(2):151–165.

[2] LIU C,WANG S J,COPELAND L,et al.Physicochemical properties and *in vitro* digestibility of starches from field peas grown in China[J].LWT:Food Science and Technology,2015,64(2):829–836.

[3] 刘文.不同直/支链淀粉比对羔羊生长性能、养分消化率及肉质的影响[D].硕士学位论文.大庆:黑龙江八一农垦大学,2015.

[4] REN W,ZHAO F F,ZHANG A Z,et al.Gastrointestinal tract development in fattening lambs fed diets with different amylose to amylopectin ratios[J].Canadian Journal of Animal Science,2016,96(3):425–433.

[5] 赵芳芳,张爱忠,姜宁,等.淀粉对动物胃肠道菌群影响的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2015(15):71–74.

[6] ZHAO W J,WANG Y P,LIU S Y,et al.The Dynamic distribution of porcine microbiota across different ages and gastrointestinal tract segments[J].PLoS One,2015,10(2):e0117441.

[7] NIU Q,LI P H,HAO S S,et al.Dynamic Distribution of the Gut microbiota and the relationship with apparent crude fiber digestibility and growth stages in pigs[J].Scientific Reports,2015,5:9938.

[8] ENGLYST H N,KINGMAN S M,CUMMINGS J H.Classification and measurement of nutritionally important starch fractions[J].European Journal of Clinical Nutrition,1992,46Suppl 2:S33－S50.

[9] HUO W J,ZHU W Y,MAO S Y.Impact of subacute ruminal acidosis on the diversity of liquid and solid-associated bacteria in the rumen of goats[J].World Journal of Microbiology and Biotechnology,2014,30(2):669–680.

[10] CALLAWAY T R,DOWD S E,EDRINGTON T S,et al.Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing[J].Journal of Animal Science,2010,88(12):3977–3983.

[11] ROSS E M,MOATE P J,BATH C R,et al.High throughput whole rumen metagenome profiling using untargeted massively parallel sequencing[J].BMC Genetics,2012,13:53.

[12] 岳喜新.蛋白水平及饲喂量对早期断奶羔羊生长性能及消化代谢的影响[D].硕士学位论文.阿拉尔:塔里木大学,2011.

[13] WALKER D M,WALKER G J.The development of the digestive system of the young animal.V.the development of rumen function in the young lamb[J].Journal of Agricultural Science,1959,53(3):374–380.

[14] MINATO H,OTSUKA M,SHIRASAKA S,et al.Colonization of microorganisms in the rumen of young calves[J].Journal of General and Applied Microbiology,1992,38(5):447–456.

[15] LIU K L,WANG J Q,BU D P,et al.Isolation and biochemical characterization of two lipases from a metagenomic library of China Holstein cow rumen[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,2009,385(4):605–611.

[16] 张永婧,刘强,张文明,等.不同纤维来源饲粮和细胞壁降解酶对猪肠道微生物菌群多样性的影响[J].动物营养学报,2016,28(10):3275－3283.

[17] 田亚东,张大为,李敬,等.不同谷物饲粮对肉仔鸡肠道微生物群落多样性的影响[J].华北农学报,2013,28(4):184－189.

[18] SAKAMOTO M,TAKAGAKI A,MATSUMOTO K,et al.*Butyricimonas synergistica* gen.nov.,sp.nov.and *Butyricimonas virosa* sp.nov.,butyric acid-producing bacteria in the family '*Porphyromonadaceae*' isolated from rat faeces[J].International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2009,59(7):1748–1753.

[19] ZE X L.Degradation and utilization of resistant starch by microbiota in human large intestine[J].Journal of Dentistry,2013,41(1):60–70.

[20] ZHANG K G,DONG X Z.*Selenomonas bovis* sp. nov.,isolated from yak rumen contents[J].International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2009,59(8):2080–2083.

Effects of Amylose to Amylopectin Ratio in Concentrate on Rumen Bacterial Community in Lambs

YU Yangyang[1] ZHAO Fangfang[1,2] ZHANG Aizhong[1]* JIANG Ning[1] LI Yanbing[1] CHEN Yong[1]

(1. *College of Animal Science and Veterinary Medicine*, *Heilongjiang Bayi Agricultural University*, *Daqing* 163319, *China*; 2. *College of Animal Science and Technology*, *Yangzhou University*, *Yangzhou* 225009, *China*)

Abstract: The objective of this study was to determine the effects of amylose to amylopectin ratio in concentrate on rumen bacterial community in lambs at different days of age. Forty-eight male lambs with no significant difference in body weight （P>0.05） were randomly divided into 4

*Corresponding author, professor, E-mail: aizhzhang@sina.com

（责任编辑 王智航）

groups, there were 3 replicates per group with 4 lambs per replicate. The concentrate amylose to amylopectin ratio of different groups was 0.12 (tapioca starch), 0.23 (corn starch), 0.24 (wheat starch) and 0.48 (pea starch), respectively. The whole experiment period was 77 days. One lamb from each replicate were randomly selected and slaughtered at 21, 35, 56 and 77 days of age to collect rumen fluid sample. The diversity of rumen bacterial community in lambs was determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The results showed that there was no effect on diversity index, evenness and richness of lambs at 21, 35, 56 and 77 days of age （P>0.05）. Diversity index in lambs at 21 days of age was significant higher than that at 35 days of age （P<0.05），and it was increased at 56 and 77 days of age, but the numerical values were still lower than that at 21 days of age. Bands recovered from DGGE were almost belonged to Bacteroidetes and Firmicutes. *Selenomonas bovis* content in rumen in lambs at 56 days of age in wheat starch group was higher. Therefore, different amylose to amylopectin ratio in concentrate do not affect the structure of lamb rumen dominant bacteria, but feed wheat starch diet can promote the growth of *Selenomonas bovis* in rumen in lambs at 56 days of age.

Key words: amylose to amylopectin ratio; lamb; PCR-denaturing gradient gel electrophoresis; rumen bacterial community; diversity index